



Οδηγίες για απομόνωση και αποστολή δειγμάτων για Κυτταρομετρία Μάζας (CyTOF)

Κατευθυντήριες οδηγίες προς το ερευνητικό, ιατρικό και παραϊατρικό προσωπικό, σχετικά με την επιλογή αναλώσιμων υλικών που πρέπει να χρησιμοποιηθούν κατά την δειγματοληψία και πληροφορίες για τις διαδικασίες δειγματοληψίας και αποστολής δειγμάτων προς το pMedGR.

pMedGR Technical information for sample collection_CyTOF_v1.0



ΕΠΑνεΚ 2014-2020
ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΑΝΤΑΓΩΝΙΣΤΙΚΟΤΗΤΑ • ΕΠΙΧΕΙΡΗΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ • ΚΑΙΝΟΤΟΜΙΑ



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Ταμείο
Περιφερειακής Ανάπτυξης



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ
ΟΙΚΟΝΟΜΙΑΣ & ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΓΡΑΜΜΑΤΕΙΑ ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΩΝ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΩΝ



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ,
ΕΡΕΥΝΑΣ & ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ



ΕΙΔΙΚΗ ΓΡΑΜΜΑΤΕΙΑ
ΕΡΕΥΝΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΕΣΠΑ
2014-2020
ανάπτυξη - εργασία - αλληλεγγύη

Περιεχόμενα

1. Γενικές Οδηγίες.....	3
2. Περιφερικό Αίμα.....	4
3. Κύτταρα.....	5
4. Φρέσκος ιστός από Βιοψίες	6
5. Κυτταροκαλλιέργειες.....	7
6. Μυελός Οστών.....	8

1. Γενικές Οδηγίες

Κατά την διαδικασία απομόνωσης κυττάρων από τον ιστό και την προετοιμασία του δείγματος (προ-αναλυτική φάση) για ανάλυση με Κυτταρομετρία Μάζας (CyTOF) θα πρέπει απαραίτητα να ακολουθούνται τα παρακάτω:

- Για πλήρωση με αίμα σωληνάρων με L-Heparin ή EDTA και ανάλυση με Κυτταρομετρία Μάζας (CyTOF), στην περίπτωση που αυτά είναι τα πρώτα σωληνάρια που θα πληρωθούν, τότε τα πρώτα 2 mL του αίματος θα πρέπει να απορριφθούν και η συλλογή να γίνει από το αίμα που θα ληφθεί μετά.
- Απαγορεύεται η χρήση γυάλινων υλικών κατά την απομόνωση και προετοιμασία του δείγματος. Εναλλακτικά πρέπει να γίνεται χρήση πλαστικών μπουκαλιών και υλικών τόσο για την δημιουργία όσο και για τη διατήρηση των διαλυμάτων και των θρεπτικών μέσων που θα χρησιμοποιηθούν στον ιστό και στα κύτταρα που θα αναλυθούν με Κυτταρομετρία Μάζας (CyTOF). Η αποφυγή των γυάλινων ειδών είναι υποχρεωτική και αφορά σε όλα τα στάδια της προετοιμασίας του δείγματος, από την απομόνωση του δείγματος από τον δότη (π.χ. τριβλία, ράβδοι), την μεταφορά και την απομόνωση των κυττάρων προς ανάλυση.
- Απαγορεύεται η χρήση ειδών (πλαστικά, γυάλινα) που έχουν υποστεί αποστείρωση σε κλίβανο. Η οδηγία αυτή αφορά και στα ακροφύσια (tips) που χρησιμοποιούνται σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας από την απομόνωση του δείγματος μέχρι την ολοκλήρωση της ανάλυσης.
- Όλα τα υλικά που χρησιμοποιούνται πρέπει να είναι πολύ καλά ξεπλυμένα από τα απορρυπαντικά πλύσης και το ξέπλυμα πρέπει να γίνεται με υπερκάθαρο απιονισμένο νερό με χαρακτηριστικά καθαρότητας 18 MΩ.
- Δεν πρέπει σε κανένα στάδιο της προετοιμασίας του δείγματος, από την απομόνωση του από το σώμα του δότη μέχρι την απομόνωση των κυττάρων να χρησιμοποιούνται γάντια latex ή οποιοδήποτε άλλο υλικό με συστατικό το latex.
- Να μην χρησιμοποιείται το λαστιχένιο (καουτσούκ) τμήμα του εμβόλου της σύριγγας για την αποδιάταξη του ιστού ή γυάλινες ράβδοι.
- Το PBS που θα χρησιμοποιηθεί πρέπει να είναι ελεύθερο από $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ που συνήθως είναι και χαμηλής περιεκτικότητας σε ^{138}B (βάριο) και ^{133}Cs (καίσιο).
- Κατά την απομόνωση κυττάρων με χρήση υλικών όπως Ficoll ή Histopaque που κάνουν χρήση διαβάθμιση συγκέντρωσης πρέπει να μην υπάρχει επιμόλυνση του απομονωμένου τμήματος των κυττάρων από το υλικό.
- Σε περίπτωση που ο ασθενής έχει υποστεί εξετάσεις κατά τις οποίες έχει γίνει χρήση σκιαγραφικών μέσα απεικόνισης όπως Ιώδιο, Βάριο, Γαδολίνιο πρέπει να υπάρχει ενημέρωση του υπεύθυνου του τμήματος Κυτταρομετρία Μάζας (CyTOF).
- Σε περίπτωση που ο ασθενής έχει δεχθεί χημειοθεραπεία με Cis-Πλατίνα, πρέπει να υπάρχει ενημέρωση του υπεύθυνου του τμήματος Κυτταρομετρία Μάζας (CyTOF).

- Για κύτταρα από ασθενείς με καρκίνο προτιμάται η χρήση cis-Platin ή Rhodidium ως δείκτη ζωντανών κυττάρων. (Με αυτό τον τρόπο αποφεύγουμε τον αποκλεισμό παραπάνω μετάλλων από τις επιλογές μας κατά την ανάλυση των δειγμάτων.)
- Το τελικό κυτταρικό διάλυμα να μην περιέχει συσσωματώματα κυττάρων και άλλες μη κυτταρικές προσμίξεις.

Για ανάλυση κυτταρικών πληθυσμών:

- Δείγματα κυττάρων που παραλαμβάνονται σε διάλυμα στο pMedR προς ανάλυση με κυτταρομετρία Μάζας (CyTOF), όπως για παράδειγμα απομονωμένα περιφερικά λεμφοκύτταρα του αίματος, πρέπει να έχουν ποσοστό ζωντανών κυττάρων άνω του 90% για να γίνουν αποδεκτά. Στην περίπτωση παγωμένων κυττάρων, το ποσοστό ζωντανών κυττάρων μετά την επανασύστασή τους σε θρεπτικό διάλυμα θα πρέπει να είναι <90%. Σε αυτή τη περίπτωση απαιτείται επιπλέον διαδικασία απομάκρυνσης των νεκρών κυττάρων πριν την ανάλυση του δείγματος.
- Ο κυτταρικός πληθυσμός πρέπει να είναι απαραίτητα μονοκύτταρος χωρίς συσσωματώματα. Τα κύτταρα απομονώνονται ως μονοκύτταρος πληθυσμός, καταμετρούνται ποσοτικά και ως προς την ζωτικότητα τους και επαναδιαλύονται σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο σύμφωνα με το ερευνητικό πρωτόκολλο.

Σημείωση: Για τους παραπάνω λόγους, δείγματα που είναι αποθηκευμένα σε βιο-τράπεζες ιστών και δειγμάτων, τα οποία δεν έχουν απομονωθεί και φυλαχθεί με τις παραπάνω συνθήκες, δεν γίνονται αποδεκτά για ανάλυση με Κυτταρομετρία Μάζας (CyTOF) στο pMedGR.

Πίνακας: Περιληπτικά, πρακτικές οδηγίες για δείγματα προς ανάλυση με Κυτταρομετρία Μάζας (CyTOF)

Να αποφεύγονται	Υποχρεωτική χρήση
Έμβολο σύριγγας από καουτσούκ	Υπερκάθαρου νερού (καθαρότητας 18. ΜΩ)
Γυάλινα είδη (μπουκάλια, τριβλία, κ.α.)	PBS χαμηλής περιεκτικότητας σε ^{138}B και ^{133}Cs και ελεύθερο από $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$
Αποστειρωμένα ήδη σε κλίβανο	
Latex (γάντια, πλαστικά)	
Επιμόλυνση από Ficoll ή Histopaque	

2. Περιφερικό Αίμα

2.1. Σταθερότητα βιολογικού υλικού

Η χρονική διάρκεια σταθερότητας των συστατικών του αίματος ποικίλει με το συστατικό και τη θερμοκρασία διατήρησης. Η πάροδος του χρόνου μειώνει τη ποιότητα του βιολογικού υλικού. Για εφαρμογές ανάλυσης κυττάρων με Κυτταρομετρία Μάζας (CyTOF) η θερμοκρασία δωματίου 18-30°C διατηρεί την κυτταρική αντιπροσώπευση πιο κοντά στην εικόνα του δότη για περίπου 24 ώρες. Θα πρέπει να αποφεύγεται η συντήρηση των δειγμάτων σε θερμοκρασίες ψύξης.

2.2. Δοχείο Συλλογής

Κατά προτίμηση σωληνάρια με Ηπαρίνη (Li-Heparin). Σωληνάρια με EDTA είναι επίσης αποδεκτά.

2.3. Ποσότητα

Οι ποσότητες που περιγράφονται παρακάτω είναι ενδεικτικές και ικανοποιητικές για την πλειονότητα των διαθέσιμων αναλύσεων. Μπορεί να διαφοροποιηθούν ανά περίπτωση σε πιο σύνθετες αναλύσεις.

Ενήλικες: 10-15 mL

Παιδιά: Μετά από συνεννόηση με το τμήμα CyTOF

Έμβρυα/ομφάλιος λώρος: Μετά από συνεννόηση με το τμήμα CyTOF

2.4. Συντήρηση μέχρι την αποστολή στο pMedGR

Θερμοκρασία δωματίου 15-30° C για λιγότερο από 12 ώρες, ψύξη στους 2-8° C για χρονικό διάστημα λιγότερο των 24 ωρών αλλά με απώλεια κυτταρικών πληθυσμών και πληροφορίας.

Σημείωση: ΜΗΝ ΚΑΤΑΨΥΧΕΤΕ το αίμα.

2.5. Μεταφορά

Για το ολικό περιφερικό αίμα, η μεταφορά πρέπει να γίνεται σε θερμοκρασίες περιβάλλοντος 18-30° C, όσο το δυνατόν συντομότερα και εντός 24 ωρών από την απομόνωσή του.

3. Κύτταρα

Απομονωμένος κυτταρικός πληθυσμός, από διάφορες πηγές όπως αίμα, ιστό, κυτταροκαλλιέργεια.

Για αναλυτικές εφαρμογές σε Κυτταρομετρία Μάζας (CyTOF), ο κυτταρικός πληθυσμός πρέπει να είναι απαραίτητα μονοκύτταρος χωρίς συσσωματώματα. Τα κύτταρα απομονώνονται ως μονοκύτταρος πληθυσμός, καταμετρούνται ποσοτικά και ως προς την ζωτικότητά τους και επαναδιαλύονται σε κατάλληλο μέσο ανάλογα την ανάλυση που θα ακολουθήσει. Σε περιπτώσεις κυττάρων που είναι παγωμένα, η ζωτικότητα τους μετά την επανασύσταση του διαλύματός τους σε θερμοκρασία δωματίου θα πρέπει να είναι άνω του 60% για να γίνουν αποδεχτά από το pMedGR.

3.1. Σταθερότητα βιολογικού υλικού

Τα κύτταρα συντηρούνται καλύτερα στις θερμοκρασίες που πλησιάζουν την θερμοκρασία του σώματος. Στα κύτταρα απομονωμένα ex-vivo, η φυσιολογία μεταβάλλεται και απομακρύνεται από μία αντιπροσωπευτική εικόνα του δότη, με την πάροδο του χρόνου και την απόκλιση της θερμοκρασίας συντήρησης από τη φυσιολογική. Ο κυτταρικός μοριακός χαρακτήρας μπορεί να συντηρηθεί καλύτερα σε θερμοκρασίες ψύξης, εις βάρος όμως της συνολικής κυτταρικής επιβίωσης. Όταν τα κύτταρα είναι από κυτταρικές αθάνατες σειρές ο χρόνος διατήρησής τους για λίγους πολλαπλασιασμούς δεν επηρεάζει τη φυσιολογία τους.

3.2. Κύτταρα παγωμένα σε θρεπτικό μέσο και DMSO (προτεινόμενο πρωτόκολλο με DMSO)

3.2.1. Δοχείο

Κρυοανθεκτικά σωληνάρια χωρητικότητας $\geq 2,0$ mL-15 mL.

3.2.2. Ποσότητα

Κύτταρα που να αριθμούν $>10^7$.

3.2.3. Συντήρηση μέχρι την αποστολή στο pMedGR

Σε υγρό άζωτο, θερμοκρασία $<-140^\circ\text{C}$.

3.2.4. Μεταφορά

Τα κύτταρα πρέπει να μεταφερθούν είτε σε ξηρό πάγο ή σε υγρό άζωτο και σε μέγιστη θερμοκρασία -140°C .

3.3. Κύτταρα σε θρεπτικό μέσο

3.3.1. Δοχείο

Φλάσκες κυτταροκαλλιέργειας κατάλληλης χωρητικότητας.

3.3.2. Ποσότητα

10^7 μεμονωμένα ζωντανά κύτταρα

3.3.3. Συντήρηση μέχρι της αποστολή στο pMedGR

Συντήρηση σε συνθήκες κατάλληλες με βάση το ερευνητικό πρωτόκολλο.

3.3.4. Μεταφορά

Θερμοκρασία περιβάλλοντος $18-37^\circ\text{C}$, σε στείρες συνθήκες.

4. Φρέσκος ιστός από Βιοψίες

Σημείωση: Παρακαλούμε δείτε τις κατευθυντήριες οδηγίες που αφορούν σε κάθε πρωτόκολλο που αφορά σε δειγματοληψία που σχετίζεται με ανάλυση Κυτταρομετρίας Μάζας.

4.1. Σταθερότητα βιολογικού υλικού

Η σταθερότητα του βιοπτικού υλικού εξαρτάται από τη φύση του ιστού, το υλικό στο οποίο θα συντηρηθεί, τη θερμοκρασία, το χρόνο, τον τρόπο που απομονώθηκε και μία σειρά άλλων παραγόντων που επηρεάζουν τη φυσιολογία του ιστού. Ο χρόνος ισχαιμίας στους 37°C και ο χρόνος ισχαιμίας στη θερμοκρασία δωματίου μαζί με το υλικό στο οποίο συντηρείται ο ιστός καθορίζουν ουσιαστικά τη ποιότητα του παραγόμενου βιολογικού υλικού προς απομόνωση. Ο ιστός που θα επεξεργαστεί για ανάλυση Κυτταρομετρίας Μάζας δεν πρέπει να καταψύχεται.

4.2. Είδη ιστών

Ενδεικτικά, βιοπτικό υλικό από αρθρικό υμένα, αρθρικό υγρό, πνεύμονας, σιελογόνο αδέν, ήπαρ, εντερικό ιστό.

4.3. Δοχείο συλλογής

Στείρο πλαστικό δοχείο που κλείνει ερμητικά, με στείρο θρεπτικό μέσο (DMEM) που να καλύπτει το σύνολο του βιοπτικού υλικού.

4.4. Ποσότητα

Μετά από συνεννόηση με το τμήμα του CyTOF, ανάλογα τον ιστό και την απαιτούμενη ανάλυση.

4.5. Συντήρηση μέχρι την αποστολή στο pMedGR

Ιστός σε θρεπτικό μέσο διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου 18-24° C. Η παράδοση θα πρέπει να γίνεται εντός λίγων ωρών από την απομόνωση του ιστού. Οι χρόνοι εξαρτώνται από το είδος του ιστού και μία σειρά άλλων παραγόντων που επηρεάζουν τη ποιότητα των παραγώγων από τον ιστό.

4.6. Μεταφορά

Τα δείγματα πρέπει να μεταφέρονται σε θερμοκρασία παρόμοια με αυτή στην οποία έχουν διατηρηθεί μέχρι την αποστολή τους και ανάλογα τον ιστό και το πρωτόκολλο που θα ακολουθηθεί για την επεξεργασία και την ανάλυσή του.

5. Κυτταροκαλλιέργειες

Για ανάλυση αθάνατων κυτταρικών σειρών από κυτταροκαλλιέργειες το pMedGR μπορεί να δεχτεί κυτταροκαλλιέργειες διατηρώντας τις για σύντομο χρονικό διάστημα μέχρι την ανάλυσή τους. Για κυτταροκαλλιέργειες που αφορούν πρωταρχικές καλλιέργειες από κύτταρα δοτών, θα πρέπει να προηγείται συνεννόηση και ενημέρωση με το pMedGR όσον αφορά τα θρεπτικά που χρησιμοποιούνται, τυχόν επεξεργασία των φλασκών ή διαφοροποιήσεις σε θερμοκρασία και ποσοστό του CO₂.

5.1. Σταθερότητα

Για αθάνατες κυτταρικές σειρές συνήθως τα κύτταρα είναι σταθερά μέχρι 12 ώρες από την απομάκρυνσή τους από τον επωαστικό θάλαμο σε θερμοκρασία ψύξης (2-8° C). Ανά περίπτωση κυττάρων ο χρόνος μπορεί να είναι μικρότερος από τις 12 ώρες.

5.2. Δοχείο

Δύο φλάσκες 25 cm² με ~70% πληρότητα σε κύτταρα.

5.3. Ποσότητα

Δύο φλάσκες 25 cm² με ~70% πληρότητα σε κύτταρα.

Σημείωση: Το εργαστήριο που αποστέλλει τις κυτταρικές σειρές θα πρέπει να διατηρεί την αρχική κυτταρική σειρά και όχι να αποστέλλει όλο το απόθεμα.

5.4. Συντήρηση μέχρι την αποστολή στο pMedGR

Διατήρηση σε επωαστικό θάλαμο ανάλογα τις συνθήκες καλλιέργειας της κυτταρικής σειράς.

5.5. Μεταφορά δείγματος

Τα δείγματα πρέπει να αποστέλλονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος 18-37° C εντός 4 ωρών.

6. Μυελός Οστών

6.1. Σταθερότητα

Όταν φυλάσσεται κατάλληλα μπορεί να διατηρηθεί μέχρι 2 μέρες στους 2-8°C, με απώλεια όμως κυτταρικών πληθυσμών και αλλοιώσεις στα DNA/RNA και πρωτεΐνες. Το δείγμα μυελού οστών δεν είναι σταθερό πάνω από 48 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και μετά τις 24 ώρες παρατηρείται επιδείνωση στη ποιότητα και ποσότητα του DNA και του RNA σε όλες τις θερμοκρασίες.

6.2. Δοχείο μεταφοράς

Κατά προτίμηση σωληνάρια με Ηπαρίνη (Li-Heparin). Σωληνάρια με EDTA είναι επίσης αποδεκτά.

6.3. Ποσότητα

Ενήλικες: 5-6 mL

Παιδιά: 2 mL Μετά από συνεννόηση με το τμήμα Κυτταρομετρίας Μάζας

Έμβρυα/Ομφάλιος Λώρος: 2 mL Μετά από συνεννόηση με το τμήμα Κυτταρομετρίας Μάζας

6.4. Συντήρηση μέχρι την αποστολή στο pMedGR

Σε θερμοκρασία δωματίου 18-24° C για απομόνωση κυττάρων.

Σημείωση: Το δείγμα ΔΕΝ ΠΡΕΠΕΙ ΝΑ ΚΑΤΑΨΥΧΕΤΑΙ.

6.5. Μεταφορά

Σε θερμοκρασία δωματίου μέσα σε 24 ώρες.